取 扱 説 明 書

シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット(緑膿菌用)

Cica Geneus® Pseudo POT KIT

1. はじめに

本キットは緑膿菌*(Pseudomonas aeruginosa)*および多剤耐性緑膿菌(Multi-drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP)の分子疫学解析を行うための遺伝子型別キットです。愛知県衛生研究所の鈴木匡弘先生と金沢医科大学の飯沼由嗣先生らによって開発された PCR-based ORF Typing 法(POT 法)を元に操作性の向上を図っております。
本キットでは 2 本の反応チューブを用いてマルチプレックス PCR を行ない、目的サイズのバンドの有無を判定することで、緑膿菌の遺伝子型を決定します。

2. 製品形態

製 品 名	シカジーニアス® 分子疫学解析 POT キット(緑膿菌用) Cica Geneus® Pseudo POT KIT
製品番号	08187-96
容 量	50 回分
保管温度	冷凍保存 (-20 ℃以下)

3. 構成試薬 (50 回)

	個別名称	容量
試薬 A (ラベル白)	AptaTaq DNA Master (5×Conc.)※1	500 µL×1
試薬 B (ラベル赤)	PCR サプリメント	500 µL×1
試薬 C (ラベル紫)	プライマーミックスα	250 µL×1
試薬 D (ラベル緑)	プライマーミックスβ	250 µL×1
試薬 E (ラベル黄)	ポジティブコントロール	250 µL×1
試薬 F (ラベル青)	6×ローディングバッファー	500 µL×1

※1AptaTaq DNA Master は、Roche Diagnostics K. K.の商品です。

4. 本キット以外に必要な試薬(別売)

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニアス® DNA 抽出試薬	120 回	テンプレート調製
本キットは上記シカジーニアス® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
72108	クロモアガーMDRP スクリーン培地	10 枚	選択分離培地
01089-23	アガロース KANTO HC	100 g	電気泳動用
46510-79	10×TBE 緩衝液	1 L	電気泳動用
14575-43	臭化エチジウム溶液(2 mg/mL)	10 mL	電気泳動用
49881-13	50 bp DNA Ladder	100 回	電気泳動用
49898-89	PCR ラック	1 個	チューブ用ラック
49898-91	NEB COOLER	1 個	チューブ用ラック

機器類は、ヒートブロック、マイクロチューブおよび PCR チューブ対応型遠心機、遺伝子増幅装置(サーマルサイクラー)、電気泳動装置、UV トランスイルミネーター、ゲル撮影装置などが必要です。また、この他 0.2 mL PCR チューブ、1.5 mL マイクロチューブ、マイクロピペット、マイクロピペット用チップ、アガロースゲル染色用トレイなどが必要です。

5. 原理

臨床あるいは環境からは多様な緑膿菌クローンが分離されます。これらは Multilocus sequence typing (MLST)法によって多様な Sequence type (ST 型)に分類されます。本キットでは Genomic islet の検出パターンによって分離菌をおおよそ MLST 法と同程度の菌株識別能力で分類するとともに、溶原ファージ検出によって菌株識別能力を高めています。さらにメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子(vim, imp)の検出が加えられ、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の推定が可能です。なお本キットのプライマーでは vim-1, vim-2, imp-1～11 のメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子が検出可能です。

表1 検出 ORF の種類とその PCR 増幅産物サイズ

	POT ナンバー	増幅サイズ(bp)	ターゲット領域
Reaction mixture 1	PCR PC	506	*P. aeruginosa* positive control
	POT1-1	336	Genomic islet-1
	POT1-2	281	Genomic islet-2
	POT1-3	235	Genomic islet-3
	POT1-4	201	Genomic islet-4
	POT1-5	175	Genomic islet-5
	POT2-1	151	vim
	POT2-2	126	Prophage-1
	POT2-3	103	Prophage-2
	POT2-4	85	Prophage-3
Reaction mixture 2	PCR PC	506	*P. aeruginosa* positive control
	POT1-6	324	Genomic islet-6
	POT1-7	271	Genomic islet-7
	POT1-8	238	Genomic islet-8
	POT1-9	204	Genomic islet-9
	POT1-10	176	Genomic islet-10
	POT2-5	150	Prophage-4
	POT2-6	124	Prophage-5
	POT2-7	105	imp

PCR PC は、緑膿菌検出用の PCR ポジティブコントロール(*pot*C)を指します。

6. 適用範囲

多剤耐性緑膿菌を含む緑膿菌

7. プロトコール

①DNA 抽出

検体中に含まれる緑膿菌を増殖可能な液体培地もしくは寒天培地(MDRP 疑いの場合はクロモアガーMDRP スクリーン培地など)を用いて培養し、別売のシカジーニアス® DNA 抽出試薬(製品番号:08178-96)を用いて DNA の抽出を行って下さい。

・シカジーニアス® DNA 抽出試薬の使用方法

1) 別途調製したシカジーニアス® DNA 抽出試薬混合液 100 µL をマイクロチューブに入れて下さい。
2) 菌液 10 µL を上記マイクロチューブに入れて軽く混合して下さい。液体培養の場合は、培養液の原液を使用して下さい。平板培養の場合は、コロニーを滅菌水に懸濁し、マクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 1～3 番程度となるように懸濁したものを菌液として下さい。菌濃度は濃すぎないようにご注意下さい。
3) 72 ℃で 6 分間、94 ℃で 3 分間インキュベートして下さい。
4) 遠心分離(15,000 rpm, 1 分間)し、その上清をテンプレート DNA として下さい。

②PCR

本キットは 2 種類のプライマーミックス(試薬 C、試薬 D)を使用します。表 2 の条件で 1 検体あたり 2 種類の反応溶液を調製し、PCR を行って下さい。ポジティブコントロール(試薬 E)を使用する場合は、テンプレート DNA と置き換えて使用して下さい。なお、反応溶液の室温放置は避けて下さい。

表 2 PCR 反応液の調製例

PCR 溶液組成	Reaction mixture 1	Reaction mixture 2
テンプレート DNA 溶液	8.0 µL	8.0 µL
試薬 A (Apta Taq DNA Master)	4.0 µL	4.0 µL
試薬 B (PCR サプリメント)	4.0 µL	4.0 µL
試薬 C (プライマーミックスα)	4.0 µL	
試薬 D (プライマーミックスβ)		4.0 µL
合計	20.0 µL	20.0 µL

反応溶液は、下記のパターン I もしくはパターン II のいずれかの条件で PCR して下さい。反応終了後は 4 ℃で保存して下さい

パターン I

1ST
94 ℃: 15 秒
65 ℃: 60 秒
] 15 回繰返し

2ND
94 ℃: 15 秒
65 ℃: 180 秒
] 10 回繰返し

パターン II

94 ℃: 15 秒
65 ℃: 30 秒+8 秒※2
] 25 回繰返し

※2 は下記のようにインキュベーション時間を 1Cycle 毎に 8 秒ずつ延ばして下さい。

1 Cycle 目 30 秒
2 Cycle 目 38 秒
3 Cycle 目 46 秒
4 Cycle 目 54 秒
…

③4%アガロースゲル電気泳動

1) 1×TBE 緩衝液を用いて、4 %アガロースゲルを作製して下さい。
2) PCR 反応後のチューブに 4 µL の試薬 F (6×ローディングバッファー)を加え、良く混合して下さい。
3) この混合液をアガロースゲルのウェルに 6 µL アプライして下さい。
4) 電気泳動条件は、100 V、60 分間程度を目安にして下さい。ミニゲルの場合、ローディングバッファー中のブロモフェノールブルーの青紫色色素がゲルから抜け出し、キシレンシアノールの青い色素がゲルの中央付近にくるまで電気泳動して下さい。ミニゲルの電気泳動装置では 100 V、45 分～1 時間 10 分程度が目安です。
分子量マーカーは 50 bp DNA Ladder が好適です。

④アガロースゲルの染色

電気泳動後のゲルを 0.5 µg/mL の臭化エチジウム溶液に約 30 分間浸し、ゲルを染色して下さい。染色後のゲルを蒸留水の入ったバットに移して脱色し、UV トランスイルミネーター下でゲルを写真撮影して下さい。

関東化学株式会社 試薬事業本部 試薬部
〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090
〒541 0048 大阪市中央区瓦町2丁目5番1号 (06)6231 1672
〒812-0007 福岡市博多区東比恵2丁目22番3号 (092)414-9361
http://www.kanto.co.jp/
e-mail: reag-info@gms.kanto.co.jp

取 扱 説 明 書

シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット(緑膿菌用)
Cica Geneus® Pseudo POT KIT

8. バンドパターンの変換

バンドパターンの読み取りは濃淡に関わらず目的サイズのバンドがある場合(1)、無い場合(0)として下さい。参考例として図 1 の電気泳動結果を解析した例を表 3 に示します。緑膿菌の PCR ポジティブコントロールを除いた 17 個の増幅産物にはそれぞれ POT 1～2 に分類される POT ﾅﾝﾊﾞｰが割り振られています。また、各 POT ﾅﾝﾊﾞｰには表 4 のように 1、2、4、8、16、32、64、128、256、512 の POT 係数が割り振られています。認識性向上のため POT 1 - POT 2 からなる POT 型へ変換しますが、POT 1 値は POT1-1～10 で検出された POT ﾅﾝﾊﾞｰと POT 係数で計算された POT ポイントの合計、POT 2 値は POT 2-1～7 で計算された POT ポイントの合計となります。POT 1 値と POT 2 値の組合せは POT 型となります。

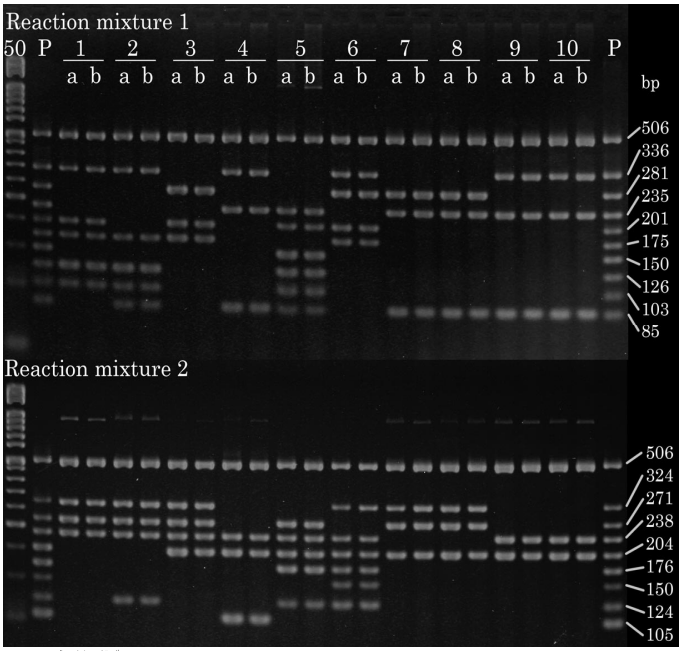

図 1 電気泳動例

下記の 8 株について POT 法解析した電気泳動パターンの実例
50: 50 bp ラダー、P: positive control、1: ATCC® 27853、2: ATCC® 35554、3: PAO1、4: imp 陽性臨床分離株、5: vim 陽性臨床分離株、6: 臨床分離株、7,8: 集団感染事例1から得られた臨床分離株、9,10: 集団感染事例2から得られた臨床分離株

泳動条件は 4 %アガロース KANTO HC(0.5×TBE 緩衝液)で、Mupid ACE の電気泳動装置を用いて、120 V、50 分間としました。Mupid シリーズのトレイ、25 穴のコームを使い、サンプルを 3 µL アプライし泳動しました。

＊愛知県衛生研究所の鈴木匡弘先生のご厚意により、電気泳動の実施例として本データをご提供いただきました。

表 3 バンドパターンの読み取り (図 1 の電気泳動結果の場合)

	POTナンバー	bp	POT係数	図1におけるサンプル番号 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reaction mixture 1	PCR PC	506	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	POT1-1	336	512	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
	POT1-2	281	256	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
	POT1-3	235	128	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
	POT1-4	201	64	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
	POT1-5	175	32	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	POT2-1	151	64	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	POT2-2	126	32	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	POT2-3	103	16	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	POT2-4	85	8	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Reaction mixture 2	PCR PC	506	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	POT1-6	324	16	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	POT1-7	271	8	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
	POT1-8	238	4	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
	POT1-9	204	2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	POT1-10	176	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	POT2-5	150	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	POT2-6	124	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
	POT2-7	105	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
POT型	POT 1			636	572	382	646	207	887	410	410	646	646
	POT 2			48	58	0	9	122	6	8	8	8	8

※解析用のエクセル計算シートは弊社製品ホームページからダウンロードできます。

表 4 POT 型 への変換方法例 (図 1 の菌株番号 1 (ATCC® 27853))

	POTナンバー	bp	POT係数		結果		POT値	
Reaction mixture 1	PCR PC	506	-		1			
	POT1-1	336	512	×	1	=	512	a = 608
	POT1-2	281	256	×	0	=	0	
	POT1-3	235	128	×	0	=	0	
	POT1-4	201	64	×	1	=	64	
	POT1-5	175	32	×	1	=	32	
	POT2-1	151	64	×	0	=	0	b = 48
	POT2-2	126	32	×	1	=	32	
	POT2-3	103	16	×	1	=	16	
	POT2-4	85	8	×	0	=	0	
Reaction mixture 2	PCR PC	506	-		1			
	POT1-6	324	16	×	1	=	16	c = 28
	POT1-7	271	8	×	1	=	8	
	POT1-8	238	4	×	1	=	4	
	POT1-9	204	2	×	0	=	0	
	POT1-10	176	1	×	0	=	0	
	POT2-5	150	4	×	0	=	0	d = 0
	POT2-6	124	2	×	0	=	0	
	POT2-7	105	1	×	0	=	0	
	POT 1 = a + c = 636 POT 2 = b + d = 48							

9. 判定

PCR PC が陽性の場合、*Pseudomonas aeruginosa* です。POT1 値は Genomic islet を検出しており、菌株の系統依存的な保有パターンを示します。POT2 値はファージとメタロ-β-ラクタマーゼに関連する遺伝子領域を検出しております。
同一 POT 型(POT1～2 の数値がすべて同一)の分離株は、水平伝播の可能性が疑われます。集団感染から得られた分離株は多くの場合、同一 POT 型となります。関連のない分離株同士が同一 POT 型になることもあるため、被検菌の検出背景(同一集団感染が疑われる要素)を加味し、総合的にご判断下さい。
POT2 の値が 64 以上または奇数の場合は、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株で、その多くに MDRP の可能性があります。なお、MDRP の判定は薬剤感受性試験結果に従って下さい。
日本で分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌について POT1 値と Sequence type(ST 型)との関係を表 5 に示します。

表 5 メタロ-β-ラクタマーゼ産生の報告がある緑膿菌の POT1 値の例と ST 型との関係

POT 1	ST	備考
108	ST654	
207	ST235	分離事例の多いクローン。MDRP の報告も多い。
383	ST244	
574	ST360/ST864	メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の報告は ST360
575	ST17/ST991	メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の報告は ST991
646	ST357	分離事例の多いクローン。MDRP の報告も多い。

10. 菌株識別能力

緑膿菌 141 株について、POT 法と MLST 法で識別試験を行ったところ、141 株は 94 の POT 型および 82 の ST 型に分類されました。ST 型は eBURST 解析により 6 つの clonal complex (CC) と 59 の singleton にまとめられた 49 種の ST 型または CC 型に分類された 108 株については POT1 値と ST 型あるいは CC 型が 1 対 1 で対応しました。26 の ST 型に分類された 33 株については POT 型としては 23 種類に分類されましたが、POT1 値については 12 種類に分類され、同一 POT1 値の中に 2 ないし 3 種類の異なる ST 型が含まれています。

11. 使用上の注意事項

1)菌株によっては非特異的な DNA 増幅断片が認められる場合があります。ポジティブコントロールを増幅した時に検出される DNA のみを判定基準として下さい(図 1)。
2) PCR 溶液は最大 50 µL 程度までスケールアップすることができます。
3)各試薬は、凍結融解を繰り返すと性能が低下する可能性があります。一度に使用しきれない場合は、-20℃で小分け保存して下さい。
4) PCR 反応溶液の室温放置は結果に影響を及ぼす可能性があります。反応溶液の調製は、氷上または PCR クーラーの使用を推奨します。
5) 使用される遺伝子増幅装置によって、温度制御誤差や昇温スピード等の違いにより、PCR 条件の最適化が必要な場合がございます。
6)本キットは研究用として販売しております。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。

12. 参考文献

・厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業、新型薬剤耐性菌に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書、研究代表者 荒川宜親

関東化学株式会社 試薬事業本部 試薬部
〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090
〒541 0048 大阪市中央区瓦町2丁目5番1号 (06)6231 1672
〒812-0007 福岡市博多区東比恵2丁目22番3号 (092)414-9361
http://www.kanto.co.jp/
e-mail: reag-info@gms.kanto.co.jp